

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 12 月 19 日 (19.12.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/101027 A1

(51) 国際特許分類: C12N 1/21, C12P  
21/02, 13/04, 19/34, 19/00, 7/40, 7/64

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/05199

(22) 国際出願日: 2002 年 5 月 29 日 (29.05.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2001-159841 2001 年 5 月 29 日 (29.05.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和  
醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO.,  
LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一  
丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森 英郎  
(MORI, Hideo) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭  
町 3 丁目 6 番 6 号 協和醸酵工業株式会社 東京研究  
所内 Tokyo (JP). 藤尾 達郎 (FUJIO, Tatsuro) [JP/JP];  
〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号

協和醸酵工業株式会社 本社内 Tokyo (JP). 西原 雅夫  
(NISHIHARA, Masao) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千  
代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和醸酵工業株式会  
社 本社内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特  
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: INDUSTRIALLY USEFUL MICROORGANISMS

(54) 発明の名称: 工業的生産に有用な微生物

(57) Abstract: Microorganism wherein one or more genes participating in the metabolism of saccharides other than D-glucose and D-fructose have been inactivated or deleted; and a process for producing useful substances such as proteins, amino acids, nucleic acids, vitamins, saccharides, organic acids, lipids or analogs thereof with the use of the above microorganisms.

(57) 要約:

本発明は、D-グルコースおよび D-フラクトース以外の糖の資化に係  
わる 1 以上の遺伝子を不活性化または欠失させた微生物、該微生物を  
用いた、タンパク質、アミノ酸、核酸、ビタミン、糖、有機酸、脂質  
あるいはそれらの類縁体等の有用物質の製造法に関する。

WO 02/101027 A1

## 明 細 書

### 工業的生産に有用な微生物

#### 技術分野

本発明は、工業的生産に有用な微生物、該微生物を用いた有用物質の製造法に関する。

#### 背景技術

微生物を用いた有用物質の製造において、目的とする有用物質の代謝経路を強化したり、該有用物質あるいはその前駆体の分解系を破壊した微生物を用いることにより、該有用物質を生産性を向上させることができることは良く知られており、そのような微生物は多数育種されている。具体的な例として、プロリン分解酵素遺伝子 *putA* を不活化した、グラム陰性細菌 *Serratia marcescens* を用いたプロリン生産〔Appl. Environ. Microbiol., 49, 782-786 (1985)〕、大腸菌 K-12 株のプロリン分解酵素遺伝子 *putA* を不活化した菌株を用いたヒドロキシプロリン生産〔Biosci. Biotech. Biochem., 64, 746-750 (2000)〕等をあげることができる。

しかしながら、このような方法は、特定の有用物質の生産にのみ有効な遺伝子の不活性化あるいは遺伝子除去であり、他の様々な有用物質の生産に汎用的に効果のある方法ではない。

現在までに、培養法による工業的製造において、遺伝子を不活性化あるいは欠失することにより、目的とする様々な有用物質の生産に汎用的に効果のある遺伝子は知られていない。

#### 発明の開示

本発明は、目的とする様々な有用物質の生産に汎用的に有効な、特定の遺伝子を不活性化あるいは欠失させた微生物、該微生物を用いた有用物質の製造方法を提供することを目的とする。

タンパク質、アミノ酸、核酸、ビタミン、糖、有機酸、脂質あるい

はそれらの類縁体等の有用物質の、微生物を利用した製造は、通常、該微生物の攪拌培養により行われる。その際使用される糖源は限られた種類である。従って、本発明者らは、微生物を利用した製造において、D-グルコースならびに D-フラクトース以外の糖の資化にかかわる遺伝子はこのような有用物質の製造には必ずしも必要ではないと考え、これら遺伝子を不活性化あるいは欠失させ、有用物質の生産効率を比較検討した。

その結果、D-グルコースならびに D-フラクトース以外の糖の資化にかかわる遺伝子群から 1 以上の遺伝子を欠失または不活性化させることにより、好氣的な条件下での有用物質の生産効率を向上させることができることを見出し本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明は下記 (1) ~ (7) を提供するものである。

(1) D-グルコースならびに D-フラクトース以外の糖の資化にかかわる 1 以上の遺伝子を不活性化または欠失させた微生物。

(2) 糖の資化にかかわる遺伝子が、*mtlA*, *mtlD*, *mtlR*, *cmtA*, *cmtB*, *gutM*, *gutQ*, *srlA*, *srlB*, *srlD*, *srlE*, *srlR*, *gldA*, *glpA*, *glpB*, *glpC*, *glpD*, *glpE*, *glpF*, *glpG*, *glpK*, *glpQ*, *glpR*, *glpT*, *glpX*, *gpsA*, *gpmA*, *gpmB*, *gatR*, *gatD*, *gatC*, *gatB*, *gatA*, *gatZ*, *gatY*, *kba*, *agaA*, *agaB*, *agaC*, *agaD*, *agaI*, *agaR*, *agaS*, *agaV*, *agaW*, *agaZ*, *lamB*, *malE*, *malF*, *malG*, *malK*, *malQ*, *malP*, *malS*, *malM*, *malT*, *malI*, *malX*, *maly*, *malZ*, *sfsA*, *mela*, *melB*, *melR*, *galE*, *galF*, *galK*, *galM*, *galP*, *galR*, *galT*, *galU*, *galS*, *mglA*, *mglB*, *mglC*, *lacI*, *lacZ*, *lacY*, *lacA*, *ebgR*, *ebgA*, *ebgC*, *bglA*, *bglB*, *bglF*, *bglG*, *bglJ*, *bglX*, *treA*, *treB*, *treC*, *treF*, *treR*, *otsA*, *otsB*, *manA*, *manX*, *manY*, *manZ*, *fucP*, *fucI*, *fucK*, *fucA*, *fucO*, *fucU*, *fucR*, *rhaP*, *rhaA*, *rhaB*, *rhaD*, *rhaR*, *rhaS*, *rhaT*, *araA*, *araB*, *araC*, *araD*, *araE*, *araF*, *araG*, *araH*, *araJ*, *xylE*, *xylA*, *xylB*, *xylF*, *xylG*, *xylH*, *xylR*, *lyx*, *rpe*, *kdgT*, *kdgK*, *exuT*, *exuR*, *edd*, *eda*, *zwf*, *uidA*, *uidB*, *uidR*, *uxaB*, *uxaA*, *uxaC*, *dgoT*, *dgoA*, *dgoK*, *dgoR*, *chbA*, *chbB*, *chbC*, *chbF*, *chbG*, *chbR*, *sgaH*, *sgaU*, *sgaA*, *sgaB*, *sgaE*, *sgaT*, *sgbE*, *sgbH*, *sgbU*, *sgcE*, *sgcA*, *sgcB*, *sgcC*, *sgcQ*, *sgcR*

および *sgcX* からなる遺伝子群およびそれらのホモログ遺伝子群より選ばれる遺伝子である、上記（１）の微生物。

（３） 微生物が、エンテロバクテリア科（*Enterobacteriaceae*）、クロストリジウム科（*Clostridiaceae*）、コリネバクテリウム科（*Corynebacteriaceae*）、シュードモナス科（*Pseudomonadaceae*）、キサントモナス科（*Xanthomonas group*）、バシラス科（*Bacillaceae*）、ミクロコッカス科（*Micrococcaceae*）およびノカルディア科（*Nocardiaceae*）からなる群より選ばれる科に属する微生物である、上記（１）または（２）の微生物。

（４） 微生物が、*Klebsiella* 属、*Erwinia* 属、*Serratia* 属、*Salmonella* 属、*Escherichia* 属、*Proteus* 属、*Clostridium* 属、*Corynebacterium* 属、*Pseudomonas* 属、*Xanthomonas* 属、*Bacillus* 属、*Arthrobacter* 属および *Rhodococcus* 属からなる群より選ばれる属に属する微生物である、上記（１）～（３）のいずれか１つに記載の微生物。

（５） 微生物が、*Klebsiella aerogenes*、*Erwinia herbicola*、*Erwinia amylovora*、*Serratia marcescens*、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia liquefaciens*、*Escherichia coli*、*Salmonella typhimurium*、*Proteus rettgeri*、*Corynebacterium glutamicum*、*Corynebacterium ammoniagenes*、*Corynebacterium mycetoides*、*Corynebacterium variabilis*、*Clostridium butyricum*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas dacunhae*、*Pseudomonas thazdinophilum*、*Xanthomonas ovyzae*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus licheniformis*、*Arthrobacter symplex*、*Arthrobacter obae* および *Rhodococcus erythropolis* からなる群より選ばれる微生物である、上記（１）～（４）のいずれか１つに記載の微生物。

（６） 上記（１）～（５）のいずれか１つに記載の微生物を培地中で培養し、該培養物中に有用物質を生成、蓄積させ、該有用物質を採取することを特徴とする有用物質の製造法。

（７） 有用物質が、タンパク質、アミノ酸、核酸、ビタミン、糖、

有機酸、脂質およびそれらの類縁体からなる群より選ばれる有用物質である、上記（６）の製造法。

以下、本発明を詳細に説明する。

## I. 本発明の微生物の造成

### （１）造成のために用いることのできる微生物

本発明の微生物を造成するために用いることのできる微生物としては、産業上利用できる微生物であればいかなる微生物も用いることができる。

このような微生物として、エンテロバクテリア科 (*Enterobacteriaceae*)、クロストリジウム科 (*Clostridiaceae*)、コリネバクテリウム科 (*Corynebacteriaceae*)、シュードモナス科 (*Pseudomonadaceae*)、キサントモナス科 (*Xanthomonas* group)、バシラス科 (*Bacillaceae*)、ミクロコッカス科 (*Micrococcaceae*)、ノカルディア科 (*Nocardiaceae*)等に属する微生物をあげることができ、例えば、*Klebsiella* 属、*Erwinia* 属、*Serratia* 属、*Salmonella* 属、*Escherichia* 属、*Proteus* 属、*Clostridium* 属、*Corynebacterium* 属、*Pseudomonas* 属、*Xanthomonas* 属、*Bacillus* 属、*Arthrobacter* 属、*Rhodococcus* 属等に属する微生物をあげることができる。

具体的には、*Klebsiella aerogenes*、*Erwinia berbericola*、*Erwinia amylovora*、*Serratia marcescens*、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia liquefaciens*、*Escherichia coli*、*Salmonella typhimurium*、*Proteus rettgeri*、*Corynebacterium glutamicum*（俗称で *Brevibacterium flavum*、*Brevibacterium lactofermentum* と呼ばれるものを含む）、*Corynebacterium ammoniagenes*、*Clostridium butyricum*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas dacunhae*、*Pseudomonas thazdinophilum*、*Xanthomonas ovyzae*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus licheniformis*、*Arthrobacter simplex*、*Arthrobacter obae*、*Rhodococcus erythropolis* 等をあげることができる。

上記微生物は野生型の微生物であっても、産業上有用な改良を施さ

れた微生物であってもよい。

即ち、上記微生物の変異株、細胞融合株、形質導入株あるいは遺伝子組換え技術を用いて造成した組換え株のいずれであってもよい。工業的に既に利用されている上記微生物であれば、下記方法により、より有効な本発明の微生物を造成することができる。

## (2) 本発明の微生物の造成

### (a) 変異処理による方法

上記(1)記載の微生物を、常法に従って培養する。培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得する。該菌体を、適切な緩衝剤、例えば、0.05M トリス-マレイン酸緩衝液(pH6.0)等で洗浄後、菌体濃度が $10^4 \sim 10^{10}$ 細胞/mlになるように同緩衝液に懸濁する。該懸濁液を用いて常法により変異処理を行う。常法として、例えば、該懸濁液にN-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)を終濃度が600mg/lになるように加え、室温で20分間保持して変異処理する方法をあげることができる。該変異処理懸濁液を完全培地に塗布し、15~38℃で、1~4日間培養する。培養後、生育し形成されたコロニーを、最少寒天培地2枚に塗布する。この時、1枚には単一炭素源としてD-グルコースを、もう1枚には単一炭素源として欠損あるいは破壊したい遺伝子が関係して代謝される糖を添加しておく。それぞれの寒天培地を15~38℃で、1~7日間培養する。D-グルコース添加では生育できるが、他の糖質を単一炭素源としては生育できない株を、目的の変異株として選択する。

### (b) 遺伝子組換えによる方法

微生物の染色体上の目的とする遺伝子を欠失あるいは不活性化させる方法として、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)に記載の方法、G. M. Churchらの方法〔Journal of Bacteriology, 179, 6228-6237 (1997)〕、B. L. Wannerらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 6640 (2000)〕等の公知の方法を用いることができる。トランスポゾンを利用して染

染色体上の遺伝子を欠失させることもできる〔Gene, 27, 131-149 (1984)〕。

また大腸菌においては、目的とする遺伝子を破壊するための直鎖 DNA 断片を *in vitro* で作成した後、エレクトロポレーションで菌体内に導入し、遺伝子置換によって目的遺伝子を破壊する方法も知られている〔Nucleic Acids Research, 27, 1296-1299 (1999)〕。

以下、G.M.Church らの方法に関して詳述する。

該方法においては、自殺遺伝子を組み込んだ温度感受性プラスミドを用いる。温度感受性プラスミドとしてはプラスミドの複製に必須のタンパク質が温度感受性になったもの等を利用でき、具体的には pK03、pKD20 等をあげることができる。自殺遺伝子としては、枯草菌由来の *sacB* 等をあげることができる。目的とする遺伝子領域の両末端 1~3kbp 程度の領域と相同な二つの DNA 断片を結合した DNA を、自殺遺伝子を組み込んだ温度感受性プラスミドに導入する。制限温度下で該プラスミドを微生物染色体上へ挿入する。得られた組換え株を自殺遺伝子が作用する条件下で培養し、生育してきた株を、該プラスミドが染色体上から脱落した株として取得する。例えば、自殺遺伝子として *sacB* を利用した場合には、自殺遺伝子が作用する培養条件としては、シュークロースを含む培地で培養する条件をあげることができる。取得された株における染色体の構造解析を行い、目的の遺伝子領域が欠落した株を選抜する。染色体の構造解析は常法に従って行うことができ、例えば、該株の染色体を鋳型とし、破壊したい遺伝子領域周辺の配列をプライマーとして用い、PCR にて周辺領域の構造を解析する方法等をあげることができる。

次に、B.L.Wanner らの方法に関して以下に詳述する。

薬剤耐性遺伝子に、目的とする遺伝子領域の両末端 1~3kbp 程度の領域と相同な DNA を付加した直鎖 DNA を PCR 法で作製する。該 DNA を入 Red 組換え系を利用し、微生物染色体上に相同組換えにより組み込む。目的とする遺伝子領域が薬剤耐性遺伝子で置き換わった株を、薬剤耐性株として選抜することができる。取得された株における染色体の構造解析を行い、目的の遺伝子領域が欠落した株であることを確認する。

染色体の構造解析は上記方法に準じて行うことができる。

目的とする遺伝子としては、D-グルコースあるいはD-フラクトース以外の糖の資化にかかわる遺伝子であれば、いずれの遺伝子でも良い。具体的には、*mtlA*、*mtlD*、*mtlR*、*cmtA*、*cmtB*、*gutM*、*gutQ*、*srlA*、*srlB*、*srlD*、*srlE*、*srlR*、*gldA*、*glpA*、*glpB*、*glpC*、*glpD*、*glpE*、*glpF*、*glpG*、*glpK*、*glpQ*、*glpR*、*glpT*、*glpX*、*gpsA*、*gpmA*、*gpmB*、*gatR*、*gatD*、*gatC*、*gatB*、*gatA*、*gatZ*、*gatY*、*kba*、*agaA*、*agaB*、*agaC*、*agaD*、*agaI*、*agaR*、*agaS*、*agaV*、*agaW*、*agaZ*、*lamB*、*malE*、*malF*、*malG*、*malK*、*malQ*、*malP*、*malS*、*malM*、*malT*、*malI*、*malX*、*malY*、*malZ*、*sfsA*、*mela*、*melB*、*melR*、*galE*、*galF*、*galK*、*galM*、*galP*、*galR*、*galT*、*galU*、*galS*、*mglA*、*mglB*、*mglC*、*lacI*、*lacZ*、*lacY*、*lacA*、*ebgR*、*ebgA*、*ebgC*、*bglA*、*bglB*、*bglF*、*bglG*、*bglJ*、*bglX*、*treA*、*treB*、*treC*、*treF*、*treR*、*otsA*、*otsB*、*manA*、*manX*、*manY*、*manZ*、*fucP*、*fucI*、*fucK*、*fucA*、*fucO*、*fucU*、*fucR*、*rhaP*、*rhaA*、*rhaB*、*rhaD*、*rhaR*、*rhaS*、*rhaT*、*araA*、*araB*、*araC*、*araD*、*araE*、*araF*、*araG*、*araH*、*araJ*、*xylE*、*xylA*、*xylB*、*xylF*、*xylG*、*xylH*、*xylR*、*lyx*、*rpe*、*kdgT*、*kdgK*、*exuT*、*exuR*、*edd*、*eda*、*zwf*、*uidA*、*uidB*、*uidR*、*uxaB*、*uxaA*、*uxaC*、*dgoT*、*dgoA*、*dgoK*、*dgoR*、*chbA*、*chbB*、*chbC*、*chbF*、*chbG*、*chbR*、*sgaH*、*sgaU*、*sgaA*、*sgaB*、*sgaE*、*sgaT*、*sgbE*、*sgbH*、*sgbU*、*sgcE*、*sgcA*、*sgcB*、*sgcC*、*sgcQ*、*sgcR*、*sgcX*等、あるいはそれらのホモログ遺伝子 (*Escherichia coli* and *Salmonella*, *Cellulara* and *Molecular Biology Volume I and II*, Second Edition, ASM Press、あるいは <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>を参照)等をあげることができる。欠失または不活性化させる、D-グルコースあるいはD-フラクトース以外の糖の資化にかかわる遺伝子の数は1以上であればよい。

## II. 本発明の微生物を用いた有用物質の製造

上記Iで造成した本発明の微生物を用いる有用物質の生産は、通常の微生物の培養法を用いて行うことができる。

該有用物質としては、タンパク質、アミノ酸、核酸、ビタミン、糖、



有機酸、脂質またはそれらの類縁体等をあげることができる。

有用物質の生産に用いる培地としては、炭素源、窒素源、無機塩、その他使用する微生物の必要とする微量の栄養素を程よく含有するものならば、合成培地または天然培地いずれも使用可能である。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は 15～40℃ がよく、培養時間は、通常 16 時間～7 日間である。培養中 pH は、3.0～9.0 に保持する。pH の調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

造成に用いた微生物が、誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物である場合には、培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、*lac* プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、*trp*

プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

有用物質が菌体外に生成、蓄積される場合には、培養終了後、培養液から菌体などの沈殿物を除去し、イオン交換処理法、濃縮法、塩析法などを併用することにより、培養液から目的とする該有用物質を単離、精製することができる。

有用物質が菌体内に生成、蓄積される場合には、培養終了後、培養液から菌体を回収した後、機械的あるいは化学的方法等の適切な方法で破碎する。該菌体破碎液から、イオン交換処理法、濃縮法、塩析法などを併用することにより、該菌体破碎液から目的とする該有用物質を単離、精製することができる。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 実施例

K-12 系統大腸菌 MG1655 株 (親株) の、キシロースおよびアミロースの分解に関与する、染色体上に連続して存在する遺伝子群 (*xylA*, *xylB*, *xylF*, *xylG*, *xylH*, *xylR* および *malS*) の両末端に隣接する約 2kbp の領域と相同な二つの DNA 断片を結合したものを、自殺遺伝子である *sacB* を有する温度感受性プラスミド pK03 に導入する。G. M. Church らの方法 [Journal of Bacteriology, 179, 6228-6237 (1997)] に準じて、該プラスミドを K-12 系統大腸菌 MG1655 株の染色体上に導入し、組換え株を取得する。該組換え株をシュークロースを含む培地で培養し、生育してきた株を、プラスミド領域が染色体より脱離した組換え株として取得する。PCR 法により組換え株染色体の構造を確認することにより、取得された組換え株の中から、プラスミドが脱離するさいに目的の遺伝子群 (*xylA*, *xylB*, *xylF*, *xylG*, *xylH*, *xylR* および *malS*) が欠落した菌株 (欠損株 1) を選抜した。〔遺伝型が [*rpsL*, *polA12*,  $\Delta(yiaH-avtA)::Km^r$ ] である OCL-11 株は、都立大学理学部加藤潤一教授より入手可能〕。

また、同様に、トレハロースの糖質分解資化に関与する遺伝子群

(*treF* および *kdgK*) を欠損している菌株 (欠損株 2) [遺伝型が [*rpsL*, *polA12*,  $\Delta(yhiW-yhjK)::Km^R$ ] である OCL-14 株は、都立大学理学部加藤潤一教授より入手可能]、グルクロン酸関連糖の資化に関与する遺伝子群 (*uxaAC*, *exuTR*) を欠損している菌株 (欠損株 3) [遺伝型が [*rpsL*, *polA12*,  $\Delta(fadH-exuR)::Km^R$ ] である OCL-33 株は、都立大学理学部加藤潤一教授より入手可能] およびグリセロールなどの糖関連物質分解資化に関与する遺伝子群 (*glpA*, *glpB*, *glpC*, *glpQ* および *glpT*) を欠損している菌株 (欠損株 4) [遺伝型が [*rpsL*, *polA12*,  $\Delta(yfaE-pmrD)::Km^R$ ] である OCL-68 株は、都立大学理学部加藤潤一教授より入手可能] を取得した。

完全培地 (Difco 社製の Antibiotic medium 3 にジアミノピメリン酸を終濃度  $50 \mu\text{g/ml}$  で添加したもの)  $8\text{ml}$  を用い、親株および欠損株をそれぞれ  $30^\circ\text{C}$  で終夜、液体培養した。得られた培養液をそれぞれ完全培地  $8\text{ml}$  に 1% 植菌し、 $30^\circ\text{C}$  で培養を行い、経時的にサンプリングした。

取得したサンプルを、 $660\text{nm}$  の吸光度の値が  $0.03 \sim 0.3$  程度になるように希釈した後、分光光度計を用いて、濁度を測定した。

また、培養 23 時間目における菌体由来のタンパク質量を下記方法により測定した。

サンプル  $200 \mu\text{l}$  を  $16,000 \times g$  にて 6 分間遠心分離した後、注意深く上清を捨てた。得られた菌体 (沈殿画分) に  $1\text{ml}$  の生理食塩水を加え、該菌体を攪拌洗浄した。洗浄後、 $16,000 \times g$  で 5 分間遠心分離し、上清を注意深く捨てた。さらに  $16,000 \times g$  で 4 分間遠心分離し、上清を注意深く捨て、壁面等に付着していた洗浄液を取り除き、洗浄菌体を取得した。該洗浄菌体は  $-30^\circ\text{C}$  で保存することが可能であったため、まとめてタンパク量を測定する場合には凍結保存した洗浄菌体を用いた。該洗浄菌体または凍結保存菌体を融解させた菌体に、 $200 \mu\text{l}$  の 1% SDS 溶液を添加し、該菌体を懸濁した後、 $100^\circ\text{C}$  で 5 分間加熱することで菌を溶解した。得られた溶解液を、1% SDS を用いて段階的に希釈した。該希釈液中のタンパク量を、バイオラッド社製の DC プロテイン アッセイキット 1 を用い、キット添付の指示書に従って測定し、培養

液 1ml あたりの菌体内タンパク量を算出した。

結果を第 1 表に示した。

親株に比べ、いずれの欠損株もより高い濁度を示していることより、いずれの欠損株も親株より生育の向上していることが示された。またこれら欠損株は、親株に比べ、有為に培地体積あたりの菌体タンパク量も増大していた。

以上の結果から、大腸菌を用いたタンパク質の生産において、D-グルコースとD-フラクトース以外の糖の資化に関わる遺伝子を不活性化することにより得られた大腸菌を用いることにより、タンパク質の生産効率を有為に向上させることができることがわかった。

第 1 表 濁度変化と培養液中の菌体タンパク量

	濁度 (OD660nm)					菌体内タンパク量 (mg/ml 培養液)
	0h	2h	4h	6h	23h	
親株	0.02	0.30	1.12	2.39	2.41	0.71
欠損株 1	0.03	0.31	1.33	2.65	2.75	0.74
欠損株 2	0.03	0.29	1.39	2.85	2.72	0.76
欠損株 3	0.03	0.26	1.32	2.62	2.84	0.75
欠損株 4	0.03	0.27	1.39	2.76	2.85	0.77

#### 産業上の利用可能性

本発明により、有用物質の生産に有用な微生物、該微生物を用いた効率的な有用物質の製造法を提供することができる。

## 請求の範囲

1. D-グルコースおよびD-フラクトース以外の糖の資化にかかわる 1 以上の遺伝子を不活性化または欠失させた微生物。

2. 糖の資化にかかわる遺伝子が、*mtlA*、*mtlD*、*mtlR*、*cmtA*、*cmtB*、*gutM*、*gutQ*、*srlA*、*srlB*、*srlD*、*srlE*、*srlR*、*gldA*、*glpA*、*glpB*、*glpC*、*glpD*、*glpE*、*glpF*、*glpG*、*glpK*、*glpQ*、*glpR*、*glpT*、*glpX*、*gpsA*、*gpmA*、*gpmB*、*gatR*、*gatD*、*gatC*、*gatB*、*gatA*、*gatZ*、*gatY*、*kba*、*agaA*、*agaB*、*agaC*、*agaD*、*agaI*、*agaR*、*agaS*、*agaV*、*agaW*、*agaZ*、*lamB*、*malE*、*malF*、*malG*、*malK*、*malQ*、*malP*、*malS*、*malM*、*malT*、*malI*、*malX*、*malY*、*malZ*、*sfsA*、*melA*、*melB*、*melR*、*galE*、*galF*、*galK*、*galM*、*galP*、*galR*、*galT*、*galU*、*galS*、*mglA*、*mglB*、*mglC*、*lacI*、*lacZ*、*lacY*、*lacA*、*ebgR*、*ebgA*、*ebgC*、*bglA*、*bglB*、*bglF*、*bglG*、*bglJ*、*bglX*、*treA*、*treB*、*treC*、*treF*、*treR*、*otsA*、*otsB*、*manA*、*manX*、*manY*、*manZ*、*fucP*、*fucI*、*fucK*、*fucA*、*fucO*、*fucU*、*fucR*、*rhaP*、*rhaA*、*rhaB*、*rhaD*、*rhaR*、*rhaS*、*rhaT*、*araA*、*araB*、*araC*、*araD*、*araE*、*araF*、*araG*、*araH*、*araJ*、*xylE*、*xylA*、*xylB*、*xylF*、*xylG*、*xylH*、*xylR*、*lyx*、*rpe*、*kdgT*、*kdgK*、*exuT*、*exuR*、*edd*、*eda*、*zwf*、*uidA*、*uidB*、*uidR*、*uxaB*、*uxaA*、*uxaC*、*dgoT*、*dgoA*、*dgoK*、*dgoR*、*chbA*、*chbB*、*chbC*、*chbF*、*chbG*、*chbR*、*sgaH*、*sgaU*、*sgaA*、*sgaB*、*sgaE*、*sgaT*、*sgbE*、*sgbH*、*sgbU*、*sgcE*、*sgcA*、*sgcB*、*sgcC*、*sgcQ*、*sgcR* および *sgcX* からなる遺伝子群およびそれらのホモログ遺伝子群より選ばれる遺伝子である、請求項 1 記載の微生物。

3. 微生物が、エンテロバクテリア科 (*Enterobacteriaceae*)、クロストリジウム科 (*Clostridiaceae*)、コリネバクテリウム科 (*Corynebacteriaceae*)、シュードモナス科 (*Pseudomonadaceae*)、キサントモナス科 (*Xanthomonas* group)、バシラス科 (*Bacillaceae*)、ミクロコッカス科 (*Micrococcaceae*) およびノカルディア科 (*Nocardiaceae*) からなる群より選ばれる科に属する微生物である、請求項 1 または 2 記載の微生物。

4. 微生物が、*Klebsiella* 属、*Erwinia* 属、*Serratia* 属、*Salmonella* 属、*Escherichia* 属、*Proteus* 属、*Clostridium* 属、*Corynebacterium*

属、*Pseudomonas* 属、*Xanthomonas* 属、*Bacillus* 属、*Arthrobacter* 属および *Rhodococcus* 属からなる群より選ばれる属に属する微生物である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の微生物。

5. 微生物が、*Klebsiella aerogenes*、*Erwinia herbicola*、*Erwinia amylovora*、*Serratia marcescens*、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia liquefaciens*、*Escherichia coli*、*Salmonella typhimurium*、*Proteus rettgeri*、*Corynebacterium glutamicum*、*Corynebacterium ammoniagenes*、*Corynebacterium mycetoides*、*Corynebacterium variabilis*、*Clostridium butyricum*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas dacunhae*、*Pseudomonas thazdinophilum*、*Xanthomonas ovyzae*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus licheniformis*、*Arthrobacter simplex*、*Arthrobacter obae* および *Rhodococcus erythropolis* からなる群より選ばれる微生物である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の微生物。

6. 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の微生物を培地中で培養し、該培養物中に有用物質を生成、蓄積させ、該有用物質を採取することを特徴とする有用物質の製造法。

7. 有用物質が、タンパク質、アミノ酸、核酸、ビタミン、糖、有機酸、脂質およびそれらの類縁体からなる群より選ばれる有用物質である、請求項 6 記載の製造法。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05199

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N1/21, C12P21/02, C12P13/04, C12P19/34, C12P19/00,  
C12P7/40, C12P7/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N1/21, C12P21/02, C12P13/04, C12P19/34, C12P19/00,  
C12P7/40, C12P7/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Naotaka KUROSE et al., Cloning of the D-Xylose Uptake Gene Linked to the xylA Gene in Escherichia coli, Agric.Biol.Chem., 1987, Vol.51, No.9, pages 2575 to 2578	1-5/6-7
X/Y	F.C.H. FRANKLIN et al., Localization and functional analysis of transposon mutations in regulatory genes of the TOL catabolic pathway, Journal of Bacteriology, 1983, Vol.154, No.2, pages 676 to 685	1-5/6-7
X/Y	Raymond PORTALIER et al., Regulation of Escherichia coli K-12 hexuronate system genes: exu regulon, Journal of Bacteriology, 1980, Vol.143, No.3, pages 1095 to 1107	1-5/6-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
25 June, 2002 (25.06.02)

Date of mailing of the international search report  
09 July, 2002 (09.07.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05199

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Masao YAMADA et al., Physical map of the nrdA-nrdB-ftsB-glpT region of the chromosomal DNA of Escherichia coli, Gene, 1982, Vol.18, No.3, pages 309 to 318	1-5/6-7
Y	Tatsuro FUJIO, "Genom no Jidai no Biotechnology - Seizo Process no Kakushin o Mezashite -, Green Biotechnology Symposium 'Genom Jidai no Green Biotechnology'", Japan Bioindustry Association, 02 March, 2001 (02.03.01), pages 89 to 101	6-7



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> C12N1/21, C12P21/02, C12P13/04, C12P19/34, C12P19/00, C12P7/40, C12P7/64

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> C12N1/21, C12P21/02, C12P13/04, C12P19/34, C12P19/00, C12P7/40, C12P7/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG)

JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	Naotaka KUROSE et al., Cloning of the D-Xylose Uptake Gene Linked to the xylA Gene in Escherichia coli, Agric. Biol. Chem., 1987, Vol. 51, No. 9, p. 2575-2578	1-5/6-7
X/Y	F. C. H. FRANKLIN et al., Localization and functional analysis of transposon mutations in regulatory genes of the TOL catabolic pathway, Journal of Bacteriology, 1983, Vol. 154, No. 2, p. 676-685	1-5/6-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.06.02

国際調査報告の発送日

09.07.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明照



4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	Raymond PORTALIER et al., Regulation of Escherichia coli K-12 hexuronate system genes: exu regulon, Journal of Bacteriology, 1980, Vol. 143, No. 3, p. 1095-1107	1-5/6-7
X/Y	Masao YAMADA et al., Physical map of the nrdA-nrdB-ftsB-glpT region of the chromosomal DNA of Escherichia coli, Gene, 1982, Vol. 18, No. 3, p. 309-318	1-5/6-7
Y	藤尾達郎, ゲノムの時代のバイオテクノロジー～製造プロセスの革新を目指して～, グリーンバイオテクノロジーシンポジウム “ゲノム時代のグリーンバイオテクノロジー”, 財団法人バイオインダストリー協会, March 2, 2001, p. 89-101	6-7